



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑳ Aktenzeichen: P 32 44 129.0
㉔ Anmeldetag: 29. 11. 82
㉕ Offenlegungstag: 10. 11. 83

③① Unionspriorität: ③② ③③ ③①
25.03.82 JP P48641-82

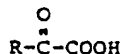
⑦① Anmelder:
Toyo Boseki K.K., Osaka, JP

⑦④ Vertreter:
Deufel, P., Dipl.-Wirtsch.-Ing. Dr.rer.nat.; Schön, A.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Hertel, W., Dipl.-Phys.;
Lewald, D., Dipl.-Ing.; Otto, D., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.,
Pat.-Anw., 8000 München

⑦② Erfinder:
Emi, Shigenori, Ootsu, JP; Kojima, Yoshio, Tsuruga,
JP; Ando, Makoto, Ootsu, JP; Yajima, Yasuo,
Tsuruga, JP

⑤④ Verfahren zur Erzeugung von α -Glycerophosphatoxidase

Es wird ein microbiologisches Verfahren zur Erzeugung von α -Glycerophosphatoxidase angegeben, bei dem die Enzymausbeute dadurch erheblich gesteigert wird, daß ein α -Glycerophosphatoxidase-produzierender Microorganismus des Genus *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* oder *Leuconostoc* in einem Nährmedium gezüchtet wird, das mindestens eine Verbindung, bestehend aus Ascorbinsäure, einer α -Ketosäure der Formel



worin R den Rest $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n$ oder $\text{CH}_2(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}-$ und m eine ganze Zahl von 1 bis 3 sowie n eine ganze Zahl von 0 bis 2 bedeuten, oder deren Salz enthält, und aus der erhaltenen Kulturbrühe α -Glycerophosphatoxidase isoliert wird. (32 44 129)

DE 3244129 A1

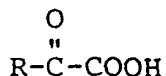
BEST AVAILABLE COPY

Toyo Boseki Kabushiki Kaisha
Osaka, Japan

Verfahren zur Erzeugung von α -Glycerophosphatoxidase

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung von α -Glycerophosphatoxidase, dadurch gekennzeichnet, daß man einen α -Glycerophosphatoxidase-produzierenden Microorganismus des Genus *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* oder *Leuconostoc* in einem Nährmedium züchtet, das mindestens eine Verbindung bestehend aus Ascorbinsäure, einer α -Ketosäure der Formel



worin R den Rest $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m-$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n-$ oder $\text{CH}_2(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ und m eine ganze Zahl von 1 bis 3 sowie n eine ganze Zahl von 0 bis 2 bedeuten, oder deren Salz enthält, und aus der erhaltenen Kulturbrühe α -Glycerophosphatoxidase iso-

1

liert.

5

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als α -Ketosäure α -Ketobuttersäure, α -Ketovaleriansäure, α -Ketocapronsäure, α -Ketomalonsäure, Oxalessigsäure, α -Ketoglutarsäure oder α -Ketogluconsäure einsetzt.

10

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Salz dieser Säure das Natriumsalz, Kaliumsalz oder Kalziumsalz einsetzt.

15

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die aus Ascorbinsäure, der α -Ketosäure oder deren Salz bestehende Verbindung in einer Menge von 1 bis 10 g/l Nährmedium einsetzt.

20

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die aus Ascorbinsäure, der α -Ketosäure oder deren Salz bestehende Verbindung in einer Menge von 2 bis 5 g/l Nährmedium einsetzt.

25

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Microorganismus *Pediococcus acidilactici* (FERM BP-211), *Pediococcus cerevisiae* (FERM BP-213), *Pediococcus pentosaceus* (FERM BP-215), *Pediococcus parvulus* (FERM PB-214), *Pediococcus homari* (FERM BP-212), *Pediococcus urinae-equi* (IFO 12173, ATCC 29722), *Streptococcus faecalis* (IFO 3971), *Streptococcus faecium* (IFO 12256, ATCC 14432), *Lactobacillus leichmannii* (ATCC 4797, DSM 20076) oder *Lactobacillus fermentum* (ATCC 9338, DSM 20391) einsetzt.

30

35

1 Beschreibung

Die Erfindung betrifft das in den Patentansprüchen ange-
gebene Verfahren, das sich zur Erzeugung von α -Glycero-
5 phosphatoxidase als sehr leistungsfähig erweist.

Es ist bekannt, daß α -Glycerophosphatoxidase (im folgen-
abgekürzt als α -GPO) durch Microorganismen erzeugt wird,
die zum Genus Streptococcus (Archives of Biochemistry
10 and Biophysics, Vol. 88, 250, 1960), zum Genus Lacto-
bacillus (Journal of Biological Chemistry, Vol. 234,
2794, 1959), Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus
cerevisiae (JP-Patentveröffentlichung Nr. 72892/1978)
und zum Genus Aerococcus (JP-Patentveröffentlichung
15 15746/1980) gehören.

α -GPO eignet sich bekanntlich zur quantitativen Analyse
von L- α -Glycerophosphat in Serum oder anderen Proben,
von Glycerin durch Kombination mit Glycerinkinase, und
20 von Triglycerid durch gekoppelte Reaktion mit Lipoprotein-
lipase und Glycerinkinase, so daß α -GPO besondere Beach-
tung findet als Reagens für Forschung und klinische
Diagnose.

25 Um das bestehende Bedürfnis nach α -GPO zu befriedigen,
wurden intensive Untersuchungen durchgeführt, mit dem
Ziele, α -GPO in industriellem Maßstabe und billig zu
gewinnen und es wurde nun gefunden, daß die Erzeugung
von α -GPO wesentlich verbessert werden kann durch Züch-
30 tung eines α -GPO-produzierenden Microorganismus des
Stammes Pediococcus, Streptococcus, Lactobacillus oder
Leuconostoc in einem Nährmedium, das mindestens eine
Verbindung bestehend aus z.B. Ascorbinsäure, Oxalessig-
säure, α -Ketobuttersäure, α -Ketovaleriansäure, α -Ketogly-
35 consäure, α -Ketoglutarsäure oder deren Salze enthält.

1

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird somit der α -GPO-produzierende Microorganismus in einem Nährmedium kultiviert, dem eine der in Anspruch 1 angegebenen α -Ketosäuren, Ascorbinsäure oder deren Salze zugesetzt ist und die gesuchte α -Glycerophosphatoxidase wird aus der erhaltenen Kulturbrühe isoliert.

5

10

Erfindungsgemäß kann durch Zusatz von z.B. Ascorbinsäure, α -Ketoglutarsäure, oder deren Salz zum Nährmedium die Erzeugbarkeit von α -GPO wesentlich gesteigert werden im Vergleich zu Herstellungsverfahren, wo keine derartige Säure oder deren Salz zugegeben wird.

15

20

25

30

Geeignete erfindungsgemäß verwendbare Stämme sind z.B. α -Glycerophosphatoxidase-produzierende Microorganismen, die zum Genus *Pediococcus* gehören, z.B. *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus cerevisiae*, *Pediococcus homari*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus urinae-equi* und dergleichen. Verwendbar sind ferner α -Glycerophosphatoxidase-produzierende Microorganismen, die zum Genus *Streptococcus* gehören, z.B. *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus salvarius*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus faecium* und dergleichen und solche, die zum Genus *Lactobacillus* gehören, z.B. *Lactobacillus planterum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus pentoaceticus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus leichmannii* und dergleichen, sowie solche, die zum Genus *Leuconostoc* gehören, z.B. *Leuconostoc mesenteroides* oder dergleichen.

35

Spezielle Beispiele für erfindungsgemäß verwendbare Stämme sind *Pediococcus acidilactici* (FERM BP-211), *Pediococcus cerevisiae* (FERM BP-213), *Pediococcus pentosaceus* (FERM BP-215), *Pediococcus parvulus* (FERM BP-214),

1

5

10

~~Pediococcus homari (FERM BP-212), Pediococcus urinae-~~
equi (IFO 12173, ATCC 29722), Streptococcus faecalis
(IFO 3971), Streptococcus faecium (IFO 12256, ATCC 14432),
Lactobacillus leichmannii (IFO 3073, ATCC 4797, DSM 20076),
Lactobacillus fermentum (IFO 3071, ATCC 9338, DSM 20076)
und dergleichen, die als solche bekannt und von den an-
sprechenden Hinterlegungsstellen von der Öffentlichkeit
leicht erhältlich sind, z.B. von FERM oder FRI (Fermen-
tation Research Institute, Ibaragi, Japan) oder IFO
(Institute of Fermentation, Osaka, Japan).

15

20

Zur Züchtung der angegebenen Microorganismen in einem
Kulturmedium wird nach dem erfindungsgemäßen Verfahren
mindestens eine Verbindung, bestehend aus Ascorbinsäure,
 α -Ketosäure der in Anspruch angegebenen Formel (z.B.
 α -Ketobuttersäure, α -Ketovaleriansäure, α -Ketocaprinsäu-
re, α -Ketomalonsäure, Oxalessigsäure, α -Ketoglutarsäu-
re oder α -Ketogluconsäure) oder deren Salzen zum Nährme-
dium zugegeben, um die Produktivität des angestrebten
Enzyms zu erhöhen.

25

Als Salz dieser Säuren eignen sich z.B. die Alkalimetall-
salze, wie das Natriumsalz, Kaliumsalz und dergleichen,
und die Erdalkalimetallsalze, wie Kalziumsalz und der-
gleichen.

30

35

Beim erfindungsgemäß verwendeten Nährmedium kann es sich
um ein beliebiges bekanntes Kulturmedium handeln, wie
es üblicherweise zur Kultivierung dieser Spezies von
Microorganismen Verwendung findet, wobei lediglich die
angegebene spezielle Säure oder deren Salz zum Nährme-
dium zugesetzt wird. Ein derartiges Kulturmedium ent-
hält in der Regel eine geeignete Kohlenstoffquelle, Stick-
stoffquelle, anorganische Salze und einen organischen
Wachstumsfaktor. Als Kohlenstoffquelle sind Glycerin,

1

Glucose, Fruktose, Lactose, Saccharose, Wein- oder
Likörmelasse und dergleichen verwendbar. Als Stick-
stoffquelle werden organische Stickstoffquellen, wie
6 Pepton, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Maisquellwasser
und dergleichen bevorzugt. Als anorganische Salze
sind solche von Metallen wie Kalium, Natrium, Mangan,
Magnesium, Zink, Eisen und dergleichen, sowie Salze von
Schwefelsäure, Phosphorsäure, Salzsäure, Salpeter-
10 säure und dergleichen verwendbar. Als organischer Wach-
stumsfaktor sind Hefeextrakt und Maisquellwasser beson-
ders geeignet.

Die erfindungsgemäß verwendete Menge an Ascorbinsäure,
15 α -Ketosäuren oder deren Salze beträgt 1 bis 10 g, vor-
zugsweise 2 bis 5 g pro 1 Kulturmedium. Vorzugsweise wird
der pH-Wert des Kulturmediums etwa neutral gehalten und
die aerobe Kultivierung, z.B. unter Belüftung erfolgtes
Rühren, wird bei 25 bis 30°C während 10 bis 30 h durch-
20 geführt, um α -GPO in der Zelle anzureichern. Zur Extrak-
tion und Isolierung von α -GPO aus der auf diese Weise
erhaltenen Zelle wird diese nach einer der üblichen be-
kannten Methoden, z.B. mechanische Zerkleinerung, Ultra-
schallbehandlung, Autolyse oder Lysozymbehandlung oder
25 durch eine geeignete Kombination dieser Methoden behan-
delt zur Erzielung einer zellfreien Enzymlösung, worauf
die erhaltene Lösung nach üblichen bekannten Methoden,
z.B. Aussalzen mit Ammoniumsulfat, Ausfällen mit einem
Lösungsmittel wie Aceton, Alkohol oder dergleichen, be-
30 handelt wird zur Erzielung eines Enzympräparats. Um
höher gereinigte Enzympräparate zu erhalten, erweist sich
die Anwendung von Ionenaustauschchromatographie oder
Molekularsiebmethoden als empfehlenswert.

35

Die Bestimmung der Enzymaktivität einer nach dem erfin-
dungsgemäßen Verfahren erhaltenen α -GPO sowie deren Ei-

1

genschaften werden im folgenden anhand eines typischen
Beispiels an der aus *Pediococcus pentosaceus* (FERM PB-
215) erhaltenen α -GPO (gereinigtes Enzym mit 34,2 Ein-
heiten/mg, erhalten nach dem unten angegebenen Beispiel
2) erläutert.

10

A. Bestimmung der Enzymaktivität

15

20

Die Enzymaktivität kann bestimmt werden, indem man
 α -GPO auf D,L- α -Glycerophosphat einwirken läßt und
das gebildete Wasserstoffperoxid bestimmt. Das heißt,
die Enzymaktivität von α -GPO wird erhalten durch Zer-
setzung des gebildeten Wasserstoffperoxids mit Peroxi-
dase (POD) in Gegenwart von o-Aminophenol, wobei das
o-Aminophenol quantitativ oxidiert und die dabei ge-
bildete Farbverbindung bei 480 nm kolorimetrisch ge-
messen wird. Die Zusammensetzung der enzymatischen
Reaktionslösung und die Reaktionsbedingungen sind wie
folgt:

(1) Zusammensetzung der Reaktionslösung:

25

0,45M wäßrige D,L- α -Glycero-
phosphatlösung (pH 7,0)

1,0 ml

0,45M K-phosphat-Pufferlösung
(pH 7,0) [enthaltend 0,125 % (G/V)

30

Triton X-100 als grenzflächen-
aktives Mittel

1,0 ml

wäßrige POD-Lösung (15 Purpuro-
gallin-Einheiten/ml)

35

1,0 ml

1

0,001M wäßrige o-Aminophenol-
hydrochloridlösung 1,0 ml

5

Enzymlösung (0,004 bis 0,015
Einheiten/ml) 0,5 ml

(2) Reaktionsbedingungen:

10

Die Reaktion wird bei 37°C während 10 min durchge-
führt und danach durch Zugabe von 0,5 ml 4N-Salz-
säure abgestoppt. Die gebildete Farbverbindung wird
bei 480 nm kolorimetrisch bestimmt.

15

(3) Enzymaktivität:

1 Einheit des Enzyms ist definiert durch die Menge
des Enzyms, welche 1 µMol Wasserstoffperoxid in 1 min
unter den oben angegebenen Reaktionsbedingungen bil-
det.

20

B. Wirkung

25

Das erfindungsgemäß erhaltene Enzym oxidiert in ganz spe-
zifischer Weise L-α-Glycerophosphat unter Katalysierung
der Reaktion, bei der Dihydroxyacetonphosphat und Wasser-
stoffperoxid gebildet werden.

30

C. Enzymeigenschaften

(1) Optimaler pH-Wert und pH-Stabilität:

35

Der optimale pH-Wert des erfindungsgemäß erhaltenen
Enzyms wurde mit einer Tris-Salzsäure-Pufferlösung
(pH 7,0 bis 9,5) und einer K₂CO₃-NaHCO₃-Pufferlösung
(pH 9,0 bis 10,5) getestet und zu 8,0 bis 8,5 bestimmt.

1

5

Der pH-Bereich, in welchem das erfindungsgemäß erhaltene Enzym stabil bleibt, liegt bei 6,5 bis 8,5 bei einer 20 h langen Behandlung bei 25°C unter folgenden Bedingungen: pH 5,0 bis 7,0, 0,1M-Dimethylglutarsäure-NaOH-Pufferlösung; pH 7,0 bis 8,8, 0,1M-K-phosphat-Pufferlösung; pH 8,8 bis 10,0, K_2CO_3 - $NaHCO_3$ -Pufferlösung.

10

(2) Optimale Temperatur:

15

Die optimale Temperatur des erfindungsgemäß erhaltenen Enzyms liegt bei etwa 35 bis 40°C unter den unten angegebenen Bedingungen für die Bestimmung der Enzymaktivität.

(3) pH-Wert und Temperaturstabilität:

20

Wenn das erfindungsgemäß erhaltene Enzym 15 min lang in einer 0,1M Dimethylglutarsäure-NaOH-Pufferlösung (pH 7,0) behandelt wird, ist es bis zu 40°C stabil und behält 30 % seiner Aktivität sogar bei 50°C bei, es wird jedoch bei 55°C vollständig inaktiviert.

25

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung, wobei sich Prozentangaben auf das Gewicht beziehen.

Beispiel 1

30

35

Zu einer Nährmedium-Stammlösung mit einem Gehalt an 0,8 % Polypepton, 0,6 % Hefeextrakt, 1,0 % Glycerin, 1,5 % K_2HPO_4 , 0,5 % KH_2PO_4 , 0,05 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,005 % $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,003 % $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,002 % NaCl, 0,0002 % $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ und 0,0001 % $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ wurden jeweils 0,4 % der in Tabelle 1 aufgeführten, die α -GPO-Produktion fördernden Substanzen zugesetzt und nach Einstellung des

1

pH-Werts auf 7,2 wurde jedes Nährmedium in 500-ml-Sakaguchi-Kolben in einer Menge von 50 ml pro Kolben eingebracht und bei 120°C 15 min lang sterilisiert. Nach dem
5 Abkühlen wurde das Kulturmedium mit Hilfe einer Platinoöse mit den in Tabelle 1 angegebenen, zum Genus *Pediococcus* gehörende Mikroorganismen beimpft, die zuvor ausgesetzt waren, einer stab-Kultivierung bei 30°C während 24 h in einem Milchsäure-Bakterien-Vorratskulturmedium (Nissui Seiyaku Co.),
10 und anschließend einer Schüttelkultivierung (135 Rüttelungen pro min) bei 30°C während 20 h unterworfen. Nach der Kultivierung wurden 5,0 ml der Kulturbrühe als Proben aus jedem Kolben entnommen und bei 10000 upm 10 min lang zentrifugiert zur Abtrennung der Zellen. Die erhaltenen
15 Zellen wurden erneut suspendiert in 10 ml einer 0,1M-Kaliumphosphat-Pufferlösung (pH 7,0), die 0,005M-EDTA enthielt, worauf durch Ultraschallbehandlung zerkleinert wurde zur Solubilisierung des Enzyms. Die erhaltenen Zelltrümmer wurden durch Zentrifugieren entfernt und die
20 gewonnene überstehende Flüssigkeit wurde auf enzymatische Aktivität analysiert. Die Aktivität der erhaltenen α -GPO ist in Tabelle 1 aufgeführt. Aus Tabelle 1 ergibt sich völlig eindeutig, daß die Erzeugung von α -GPO wesentlich gesteigert wird durch die Zugabe von Oxalessigsäure,
25 α -Keto buttersäure, α -Ketovaleriansäure, α -Ketogluconsäure oder α -Ketoglutarsäure.

30

35

Tabelle 1

Stamm	α -GPO-Produktion- fördernde Substanz	Enzymaktivität (Einh./ml Kulturbrühe)					
		keine	Oxal- essig- säure	α -Keto- butter- säure	α -Keto- valerian- säure	α -Keto- glucon- säure	α -Keto- glutar- säure
<u>Pediococcus</u> <u>acidilactici</u> (FERM BP- 211)		0.057	0.47	0.41	0.35	0.15	0.41
<u>Pediococcus</u> <u>cerevisiae</u> (FERM BP- 213)		0.069	0.42	0.37	0.30	0.12	0.40
<u>Pediococcus</u> <u>pentosaceus</u> (FERM BP- 215)		0.156	0.77	0.63	0.53	0.35	0.64
<u>Pediococcus</u> <u>parvulus</u> (FERM BP- 214)		0.075	0.45	0.40	0.35	0.18	0.41
<u>Pediococcus</u> <u>homari</u> (FERM B1 - 212)		0.123	0.68	0.49	0.37	0.22	0.63
<u>Pediococcus</u> <u>urinae-equi</u> IFO 12173		0.040	0.35	0.32	0.32	0.15	0.38

Beispiel 2.

5 Zu dem in Beispiel 1 angegebenen Stamm- oder Standard-
kulturmedium wurden 0,4 % α -Ketoglutar säure und 0,04 %
eines handelsüblichen Antischaummittels (ADEKANOL LG-126
der Asahi Denka Co.) zugegeben und der pH-Wert wurde auf
7,2 eingestellt. 15 l des auf diese Weise erhaltenen
10 Nährmediums wurden in einen 30 l-Schüttelfermenter ein-
gebracht und durch Dampf bei 121°C während 15 min steri-
lisiert. Das Nährmedium wurde sodann aseptisch mit 150 ml
einer Kulturbrühe von *Pediococcus pentosaceus* (FERM BP-
215), die zuvor durch Schüttelkultivierung bei 30°C wäh-
rend 15 h in einem 2 l-Sakaguchi-Kolben unter Verwendung
15 von 350 ml des Nährmediums der gleichen Zusammensetzung
wie oben angegeben erhalten worden war, inokuliert, wo-
rauf bei 30°C während 10 h unter Belüftung (14 l/min)
und unter Rühren (160 upm) kultiviert wurde. Nach Be-
20 endigung der Kultivierung wurden 14 l der Kulturbrühe
(8400 Einheiten) mit Hilfe einer kontinuierlichen Zentri-
fuge behandelt, um die Zellen zu sammeln. Die gewonnenen
Zellen wurden in 1 l einer 0,05M-Kaliumphosphat-Puffer-
lösung (pH 7,0) suspendiert.

25 Die erhaltene Suspension wurde in einer Mühle mit Glas-
kugeln behandelt, um die Zellen zu zerkleinern. Nach der
Zerkleinerung wurde eine Suspension von 2 l unter Verwen-
dung einer 0,05M-Kaliumphosphat-Pufferlösung (pH 7,0),
hergestellt und die Zellenbruchstücke wurden durch Zentri-
30 fugieren abgetrennt. Zu der erhaltenen überstehenden
Flüssigkeit wurde zunächst Ammoniumsulfat bis zu 40%iger
Sättigung zugesetzt und der unlösliche Anteil wurde als
Niederschlag durch Zentrifugation entfernt. Danach wurde
der erhaltene Flüssigkeitsüberstand weiter mit Ammonium-
35 sulfat bis zu einer Endkonzentration von 65 % Sättigung
versetzt unter Isolierung von α -GPO als Niederschlag. Die

1

prozentuelle Aktivität, die in Form des Niederschlags isoliert wurde, betrug 80 % und die spezifische Aktivität erhöhte sich um das etwa 8-fache, wie entsprechende Untersuchungen zeigten.

Der erhaltene Niederschlag wurde in 200 ml einer 0,05M-Kaliumphosphat-Pufferlösung (pH 7,0) gelöst und die erhaltene Lösung wurde entsalzt, indem sie durch eine Säule (1,5 l-Kapazität), die mit Sephadex G-25 (Handelsprodukt der Pharmacia Co.) gepackt und zuvor mit 0,05M-Kaliumphosphat-Pufferlösung ins Gleichgewicht gesetzt worden war, geschickt wurde, wobei die aktiven Fraktionen gesammelt wurden. Die auf diese Weise erhaltene salzfreie Enzymlösung wurde durch eine DEAE-Sephrose (Handelsprodukt der Pharmacia Co.)-Säule (100 ml Kapazität), die zuvor mit einer 0,05M-Kaliumphosphat-Pufferlösung (pH 7,0) ins Gleichgewicht gesetzt worden war, geschickt, um α -GPO daran zu adsorbieren. Nach dem Waschen der Säule mit der gleichen Pufferlösung wurde die α -GPO eluiert mit einem Strom von Natriumchloridlösung, deren Konzentration graduell anstieg und die hergestellt war durch Vermischen von 300 ml der angegebenen Pufferlösung und 300 ml der gleichen Pufferlösung, die 0,5M Natriumchlorid enthielt unter Bildung des Konzentrationsgradienten an Natriumchlorid. Die eluierten aktiven Fraktionen von α -GPO wurden vereinigt, ausgesalzen mit einer 70%igen Ammoniumsulfatsättigung und danach durch ein Molekularsieb in Form einer Sephadex G-150 (Handelsprodukt der Pharmacia Co.)-Säule, die mit einer 0,02M-Kaliumphosphat-Pufferlösung (pH 7,5) ins Gleichgewicht gesetzt worden war, geschickt. Die schließlich erhaltene Lösung, bei der es sich um α -GPO-Fraktionen handelte, die eine Molekularsieb-Sephadex G-150-Säule passiert hatten, wurde sodann lyophilisiert, wobei 73 mg eines α -GPO-Präpa-

1

rats erhalten wurden. Die spezifische Aktivität dieses
 5 Produktes betrug 34,2 E/mg und die Ausbeute an Produkt
 aus dem Extrakt betrug 37,2 %.

Beispiel 3

10

Die in Beispiel 2 beschriebene Verfahrensweise wurde
 wiederholt unter Verwendung der Stämme *Pediococcus*
acidilactici FERM BP-211, *Pediococcus cerevisiae* FERM
 BP-213, *Pediococcus parvulus* FERM BP-214, *Pediococcus*
 15 *homari* FERM BP-212, *Pediococcus urinae-equi* IFO 12173.
 Durch Kultivierung und Reinigung in der angegebenen Wei-
 se wurde lyophilisierte α -GPO mit der in folgender Tabelle
 2 angegebenen spezifischen Aktivität erhalten.

20

Tabelle 2

Stamm	Spezifische Aktivität (Einh./mg)	lyophilisiertes Produkt (mg)
<u><i>Pediococcus acidilactici</i></u>		
25 FERM BP-211	24.3	65
<u><i>Pediococcus cerevisiae</i></u>		
FERM BP-213	22.1	72
<u><i>Pediococcus parvulus</i></u>		
30 FERM BP-214	24.0	68
<u><i>Pediococcus homari</i></u>		
FERM BP-212	32.0	71
<u><i>Pediococcus urinae-equi</i></u>		
35 IFO 12173	18.2	58

1

Vergleichsbeispiel 1

- 5 In gleicher Weise wie in Beispiel 1 wurden die in der Tabelle angegebenen Microorganismen des Genus *Pediococcus* in einem Nährmedium kultiviert, das Brenztraubensäure enthielt und die erhaltene α -GPO wurde gesammelt. Die Aktivität der erhaltenen α -GPO ist in der folgenden Tabelle 3 aufgeführt.

10

Tabelle 3

15	Stamm	α -GPO-Produktion- fördernde Substanz	Enzymaktivität (Einh./ml Kulturbrühe)
			Brenztraubensäure
	<u><i>Pediococcus acidilactici</i></u>		
	FERM BP- 211		0.10
20	<u><i>Pediococcus cerevisiae</i></u>		
	FERM BP- 213		0.11
	<u><i>Pediococcus pentosaceus</i></u>		
	FERM BP- 215		0.20
25	<u><i>Pediococcus parvulus</i></u>		
	FERM BP- 214		0.15
	<u><i>Pediococcus homari</i></u>		
	FERM BP- 212		0.29
30	<u><i>Pediococcus urinae-equi</i></u>		
	IFO 12173		0.10

35

1

Beispiel 4

5

Zu einem Stamm-Kulturmedium mit einem Gehalt an 0,8 %
 Polypepton, 0,6 % Hefeextrakt, 1,0 % Glycerin, 1,5 %
 K_2HPO_4 , 0,5 % KH_2PO_4 , 0,05 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,005 % $FeSO_4 \cdot$
 $7H_2O$, 0,003 % $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,002 % NaCl, 0,0002 % $CaCl_2 \cdot$
 10 $2H_2O$ und 0,0001 % $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ wurden jeweils 0,3 %
 Ascorbinsäure, Natriumsalz derselben und Kaliumsalz der-
 selben zugesetzt und nach der Einstellung des pH-Werts auf
 7,2 wurde jedes Kulturmedium in 35 ml-Proberöhrchen in
 einer Menge von 7 ml/Röhrchen eingebracht und bei 120°C
 15 15 min lang sterilisiert. Nachdem Kühlen wurde das Nähr-
 medium mit Hilfe einer Platinöse mit den in Tabelle 4 auf-
 geführten Microorganismen des Genus *Pediococcus*, die zuvor
 einer stab-Kultivierung bei 30°C während 24 h in einem
 Milchsäure-Bakterien-Stammkulturmedium (Nissui Seiyaku Co.)
 20 unterworfen worden waren, angeimpft, worauf eine Schüttel-
 kultivierung (360 Rüttelungen pro min) bei 30°C während
 20 h durchgeführt wurde. Nach der Kultivierung wurden
 5,0 ml der Kulturbrühe als Proben aus jedem Teströhr-
 25 chen entnommen und bei 10000 Upm 10 min lang zentrifu-
 giert, um die Zellen zu sammeln. Die erhaltenen Zellen
 wurden erneut suspendiert in 10 ml einer 0,1M-Kalium-
 phosphat-Pufferlösung (pH 7,0), die 0,005 m EDTA ent-
 hielten, worauf durch Ultraschallbehandlung zerkleinert
 wurde, um das Enzym zu solubilisieren. Die zerkleinerten
 30 Zellrückstände wurden durch Zentrifugieren entfernt und
 die erhaltene überstehende Flüssigkeit wurde zur Messung
 der enzymatischen Aktivität verwendet. Die Aktivität von
 α -GPO ist in der folgenden Tabelle 4 angegeben. Wie sich
 aus Tabelle 4 klar ergibt, wird die Erzeugung von α -GPO
 35 durch die Zugabe von Ascorbinsäure erheblich gesteigert.

1

Tabelle 4

5		Enzymaktivität (Einh./ml Kulturbrühe)			
	Stamm	vergleich (keine Zu- gabe)	Ascorbin- säure	Natrium- ascorbat	Kalium- ascorbat
10	<u>Pediococcus</u> <u>acidilactici</u> FERM BP-211	0.052	0.38	0.36	0.40
15	<u>Pediococcus</u> <u>cerevisiae</u> FERM BP-213	0.060	0.36	0.35	0.39
20	<u>Pediococcus</u> <u>pentosaceus</u> FERM BP-215	0.153	0.70	0.72	0.68
	<u>Pediococcus</u> <u>parvulus</u> FERM BP-214	0.068	0.37	0.40	0.40
25	<u>Pediococcus homari</u> FERM BP-212	0.112	0.58	0.56	0.60
30	<u>Pediococcus</u> <u>urinae-equi</u> IFO 12173	0.044	0.29	0.28	0.30

35

1

Beispiel 5

- 5 Zu dem in Beispiel 4 angegebenen Stamm-Kulturmedium wurden 0,3 % Natriumascorbat und 0,04 % handelsübliches Antischaummittel (ADEKANOL LG-126 der Asahi Denka Co.) zugegeben und der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt.
- 10 15 l des auf diese Weise erhaltenen Nährmediums wurden in einen 30 l-Schüttelfermenter eingebracht und durch Dampf bei 121°C 15 min lang sterilisiert. Das Medium wurde sodann aseptisch mit 150 ml einer Kulturbrühe von *Pediococcus pentosaceus* FERM BP-215, die zuvor durch Schüttelkultivierung bei 30°C während 15 h in einem
- 15 2 l-Sakaguchi-Kolben unter Verwendung von 350 ml Nährlösung der gleichen Zusammensetzung wie oben angegeben erhalten worden war, inokuliert. Daran schloß sich eine Kultivierung bei 30°C während 15 h unter Belüftung (14 l/min) und unter Rühren (160 Upm) an. Nach Beendigung
- 20 der Kultivierung wurden 14 l der Kulturbrühe (9300 Einheiten) durch kontinuierliche Zentrifugation behandelt, um die Zellen zu sammeln. Die gewonnenen Zellen wurden suspendiert in 1 l einer 0,05M-Kaliumphosphat-Pufferlösung (pH 7,0).
- 25 Die erhaltene Suspension wurde in einer Mühle mit Glas- kugeln behandelt, um die Zellen zu zerkleinern. Nach dem Zerkleinern wurde die Suspension auf 2 l gebracht mit einer 0,05M-Kaliumphosphat-Pufferlösung (pH 7,0) und
- 30 die Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugieren entfernt. Zu der erhaltenen überstehenden Flüssigkeit wurde zunächst Ammoniumsulfat bis zu 40%iger Sättigung zugesetzt und der unlösliche Anteil wurde als Niederschlag durch Zentrifugation entfernt. Danach wurde der erhaltene
- 35 Flüssigkeitsüberstand weiter mit Ammoniumsulfat versetzt bis zu einer Endkonzentration von 65 % Sättigung, wodurch α -GPO als Niederschlag gewonnen wurde. Die prozentuelle

1

5 Aktivität, die als Niederschlag isoliert wurde, betrug etwa 83 % und die spezifische Aktivität hatte sich um das etwa 8-fache erhöht, wie entsprechende Untersuchungen zeigten.

10 Der erhaltene Niederschlag wurde in 200 ml einer 0,05M-Kaliumphosphat-Pufferlösung (pH 7,0) gelöst und die erhaltene Lösung wurde entsalzt durch Durchleiten durch eine Säule (1,5 l Kapazität), die mit Sephadex G-25 gepackt und zuvor mit einer 0,05M-Kaliumphosphat-Pufferlösung ins Gleichgewicht gesetzt worden war, wobei aktive

15 Fraktionen gesammelt wurden. Die auf diese Weise erhaltene salzfreie Enzymlösung wurde durch eine DEAE-Sephadex-Säule (100 ml Kapazität), die zuvor mit einer 0,05M-Kaliumphosphat-Pufferlösung (pH 7,0) ins Gleichgewicht gesetzt worden war, geschickt, um α -GPO zu adsorbieren. Nach dem Waschen der Säule mit der gleichen Pufferlösung wurde α -GPO eluiert mit einem Strom von

20 Natriumchloridlösung, deren Konzentration graduell anstieg und die gewonnen war durch Vermischen von 300 ml der gleichen Pufferlösung und 300 ml der gleichen Pufferlösung, die 0,5M-Natriumchlorid enthielt, unter Bildung des Konzentrationsgradienten an Natriumchlorid. Die eluierten aktiven Fraktionen von α -GPO wurden vereinigt, durch 70%ige Sättigung mit Ammoniumsulfat ausgesalzen und durch eine Molekularsieb-Sephadex G-150-Säule, die

25 mit einer 0,02M-Kaliumphosphat-Pufferlösung (pH 7,5) ins Gleichgewicht gesetzt worden war, geschickt. Die schließlich erhaltene Lösung, d.h. α -GPO-Fraktionen, die eine Molekularsieb-Sephadex G-150-Säule passiert hatten, wurde sodann lyophilisiert, wobei 109,8 mg α -GPO-Präparat erhalten wurden. Die spezifische Aktivität des Produktes betrug 32,6 Einheiten/mg und die Ausbeute des Produktes aus dem Extrakt betrug 38,5 %.

30

35

1

Beispiel 6

5

Unter Verwendung der Stämme *Pediococcus acidilactici* FERM BP-211, *Pediococcus cerevisiae* FERM BP-213, *Pediococcus parvulus* FERM BP-214, *Pediococcus homari* FERM BP-212 und *Pediococcus urinae-equi* IFO 12173 wurde die Kultivierung und Reinigung in gleicher Weise wie in Beispiel 5 beschrieben durchgeführt, wobei lyophilisierte α -GPO mit der in der folgenden Tabelle angegebenen spezifischen Aktivität erhalten wurde.

15

Tabelle 5

	Stamm	Spezifische Aktivität (Einh./mg)	lyophilisiertes Produkt (mg)
20	<u><i>Pediococcus acidilactici</i></u> FERM BP- 211	25.1	67
	<u><i>Pediococcus cerevisiae</i></u> FERM BP- 213	23.2	74
25	<u><i>Pediococcus parvulus</i></u> FERM BP- 214	23.6	65
	<u><i>Pediococcus homari</i></u> FERM BP- 212	34.8	73
30	<u><i>Pediococcus urinae-equi</i></u> IFO 12173	20.5	60

35

1

Beispiel 7

5

10

Die Kultivierung wurde in gleicher Weise wie in Beispiel 4 durchgeführt, jedoch mit der Ausnahme, daß die in Tabelle 6 aufgeführten Stämme anstelle der in Tabelle angegebenen eingesetzt wurden. Die Extraktion aus den erhaltenen Zellen wurde ebenfalls wie in Beispiel 4 durchgeführt. Die Enzymaktivität wurde gemessen und die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 6 aufgeführt.

15

Tabelle 6

Stamm	Enzymaktivität (Einh./ml Kulturbrühe)			
	Vergleich (keine Zu- gabe)	Ascorbin- säure	Natrium- ascorbat	Kalium- ascorbat
<u>Streptococcus</u>				
<u>faecalis</u>	0.018	0.20	0.21	0.23
IFO 3971				
<u>Streptococcus</u>				
<u>faecium</u>	0.051	0.50	0.54	0.52
IFO 12256				
<u>Lactobacillus</u>				
<u>leichmannii</u>	0.005	0.06	0.08	0.08
DSM 20076				
<u>Lactobacillus</u>				
<u>fermentum</u>	0.002	0.03	0.05	0.05
DSM 20391				

35

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.